

Utjecaj zagrijavanja maslinovog ulja na sadržaj polifenolnih tvari

Marinac Anđić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:180482>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Iva Marinac-Andić

**Utjecaj zagrijavanja maslinovog ulja na sadržaj
polifenolnih tvari**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Mornar Turk. Izradu ovog diplomskog rada financirala je Zaklada Adris.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na ukazanoj pomoći i vodstvu kroz izradu eksperimentalnog dijela diplomskog rada, na pruženom znanju i stručnim savjetima kao i uloženom vremenu.

Jedno veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su mi uvijek bili potpora u svemu što radim.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. MASLINOVO ULJE.....	2
1.1.1. Kemijski sastav i nutritivna vrijednost maslinovog ulja	2
1.1.2. Pokazatelji kakvoće maslinovog ulja	3
1.2. POLIFENOLI.....	5
1.3. UTJECAJ ZAGRIJAVANJA NA ODRŽIVOST MASLINOVOG ULJA.....	6
2. OBRAZLOŽENJE TEME	8
1. MATERIJALI I METODE	10
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1. Kemikalije	11
3.1.2. Uzorci	11
3.1.3. Radni instrumenti	11
3.1.4. Pribor	11
3.1.4. Programski paketi.....	11
3.2. Metode	12
3.2.1. Priprema standardnih otopina.....	12
3.2.2. Ekstrakcija polifenola.....	12
3.2.2.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće.....	12
3.2.2.2. QuEChERS tehnika.....	12
3.2.3. Određivanje ukupnih polifenola primjenom UV-VIS spektrofotometrije	13
3.2.4. Ispitivanje utjecaja zagrijavanja na sadržaj ukupnih polifenola u maslinovom ulju	13
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
4.1. Optimizacija postupka ekstrakcije	15
4.2. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola primjenom Folin-Ciocalteu reagensa	19
4.3. Ispitivanje utjecaja zagrijavanja na udio ukupnih polifenola u maslinovom ulju.....	21
5. ZAKLJUČAK	22
6. LITERATURA.....	24
7. SAŽETAK.....	27
8. SUMMARY	29

1. UVOD

1.1. MASLINOVO ULJE

Maslinovo ulje je oduvijek bila važna namirnica u svakodnevnoj prehrani mediteranskog stanovništva, a od polovice dvadesetog stoljeća prelazi okvire mediteranskog bazena i postaje sve zastupljenije u zemljama srednje Europe, sjeverne i južne Amerike, Kanade i Australije gdje se provode velike promocije o kakvoći maslinovog ulja i važnosti njegove konzumacije. Glavni razlog brzog širenja i rasta proizvodnje maslinovog ulja je njegova prehrambena, preventivna pa i terapijska vrijednost. Smatra se da mediteranski način prehrane, čije je obilježje maslinovo ulje kao glavni izvor masnoća, izravno povezan s rijetkom pojavom koronarnih i malignih bolesti.

1.1.1. Kemijski sastav i nutritivna vrijednost maslinovog ulja

Budući da je dijetoterapeutski učinak maslinovog ulja na ljudski organizam direktno proporcionalan njegovoj kakvoći vrlo je važno postaviti standarde koji je definiraju. Maslinovo ulje sastavljeno je od osapunjivog dijela i neosapunjivog dijela. Osapunjivi dio čine uglavnom trigliceridi koji u svom sastavu imaju određene masne kiseline, a s obzirom na porijeklo maslinovog ulja, različit je i sastav masnih kiselina. Ukupan udio osapunjivih sastojaka ulja je od 98,5% do 99,5%. U pratnji triglicerida uvijek je manja količina spojeva iz drugih skupina, koji se nazivaju negliceridni ili neosapunjivi sastojci. Neosapunjivu frakciju čine: ugljikovodici, vitamini (tokoferoli), steroli, polifenoli, triterpeni i drugi spojevi, čiji je udio od 0,5% do 1,5% ukupne mase maslinovog ulja. Zbog iznimno složenog sastava i niskog udjela u ulju, vrlo je teško odrediti sve negliceridne komponente.

Kvalitetu maslinovog ulja moguće je definirati iz trgovačke, nutritivne i senzorske perspektive. Nutritivna vrijednost maslinovog ulja proizlazi iz njegovog kemijskog sastava, tj. visokog udjela oleinske kiseline i pratećih komponenti, kao što su polifenoli. Međunarodno vijeće za maslinovo ulje (engl. *International Olive Oil Council*, IOOC) ustanovilo je slijedeće granične vrijednosti za sastav masnih kiselina u maslinovom ulju (Žanetić i Gugić, 2006):

Palmitinska kiselina (16:0) 7,5 – 20,0%

Palmitoleinska kiselina (16:1, n-7) 0,3 – 3,5%

Stearinska kiselina (18:0) 0,5 – 5,0%

Oleinska kiselina (18:1 n-9) 55,0 – 83,0%

Linolna kiselina (18:2 n-6) 3,5 – 21,0%

α -linolenska kiselina (18:3 n-3) 0,0 – 1,5%.

Vidljivo je da u sastavu masnih kiselina maslinovog ulja prevladava jednostruko nezasićena oleinska kiselina, a manji udio imaju zasićene masne kiseline, palmitinska i stearinska te višestruko nezasićene masne kiseline linolna i α -linolenska, koje kao esencijalne masne kiseline daju posebno biološko značenje maslinovom ulju. Dakle moguće je zaključiti da prirodno maslinovo ulje visoke kakvoće ima umjerenu količinu zasićenih masnih kiselina (oko 16%), izrazito visok udjel oleinske kiseline (70-80%) i optimalnu količinu višestruko nezasićenih esencijalnih masnih kiselina (8-10%) (Žanetić i Gugić, 2006). Ovakav omjer

masnih kiselina u jednom izvoru masnoća je idealan za prevenciju kardiovaskularnih bolesti, budući da su istraživanja pokazala da zasićene masne kiseline loše utječu na lipidni profil. Višestruko nezasićene masne kiseline snižavaju LDL kolesterol, ali isto tako i HDL kolesterol, dok jednostruko zasićene masne kiseline snižavaju LDL kolesterol, no povećavaju serumsku razinu HDL kolesterola (Farràs i sur., 2012; Baggio i sur., 1988). Po tome se maslinovo ulje bitno razlikuje od drugih jestivih masti i ulja. Sastav triglicerida, tj. masnih kiselina u maslinovom ulju moguće je smatrati kao svojesvrstan fingerprint maslinovog ulja i tako služi za otkrivanje krivotvorina i potvrdu autentičnosti ulja (Longobardi i sur., 2012).

1.1.2. Pokazatelji kakvoće maslinovog ulja

Prema Pravilniku o uljima od ploda i komine maslina (NN/7/09), koji je izrađen prema međunarodnim smjernicama, definirani su osnovni pokazatelji kakvoće maslinovog ulja: udio ukupnih slobodnih masnih kiselina, peroksidni broj, koeficijenti ekstinkcije K_{232} i K_{270} i organoleptička svojstva.

Udio slobodnih masnih kiselina dogovorno se izražava kao kiselost, tj. masa u gramima slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja.

Peroksidni broj je količina onih tvari u uzorku, izražena u milimolima aktivnog kisika po kilogramu, koje oksidiraju kalij jodid u opisanim radnim uvjetima.

Spektrofotometrijsko određivanje u ultraljubičastom području može pružiti podatke o kvaliteti masti, odnosno njezinom stanju očuvanosti i promjenama prouzročenim tehnološkim procesima. Do apsorbancije na određenim valnim duljinama dolazi zbog prisutnosti konjugiranih dienskih i trienskih sustava. Te apsorbancije izražene su kao specifične ekstinkcije $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (ekstinkcija 1%-tne otopine masti u specificiranom otapalu, s duljinom puta od 1 cm) i dogovorno se označavaju s K (također i kao »koeficijent ekstinkcije«).

Provjeru senzorskih svojstava ulja provodi tijelo nadležno za provođenje službene kontrole, posredstvom grupa odabranih i osposobljenih ocjenjivača senzorskih svojstava djevičanskih maslinovih ulja koje su ovlaštene od strane Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja.

Povišene vrijednosti ukupnih slobodnih masnih kiselina bitno utječu na smanjenje kvalitete ulja i njegovog roka trajanja. Slobodne masne kiseline nastaju enzimatskom ili kemijskom hidrolizom esterske veze triglicerida i kao takve imaju prooksidativan učinak i brže autooksidiraju od estera, vjerojatno zato što slobodna karboksilna skupina katalizira nastajanje slobodnih radikala razgradnjom hidroperoksida (Paradiso i sur., 2010). Autooksidacija se aktivira kada ulje dođe u kontakt s atmosferskim kisikom (pri postupcima proizvodnje ili tijekom skladištenja). Produkti oksidacije su hidroperoksidi masnih kiselina (primarna oksidacija). Hidroperoksidi su nestabilni spojevi koji se dalje oksidiraju do hlapljivih i nehlapljivih komponenti, kao što su aldehidi, ketoni, alkoholi i drugi spojevi, koji daju ulju neugodan miris i okus, tj. užeglost (sekundarna oksidacija).

Nastanak slobodnih masnih kiselina prethodi razgradnji ulja. Također, omjer oleinske i linolne kiseline direktno se povezuje sa stabilnošću ulja jer su višestruko nezasićene masne

kiseline puno podložnije oksidacijskim promjenama. Povišene vrijednosti slobodnih masnih kiselina u ulju ponajviše su rezultat hidrolize triglicerida tijekom ranog procesa proizvodnje, od branja do prešanja, dok su voda i biljni enzimi još uvijek u kontaktu s uljem. Iz tog razloga, prešanje maslina neposredno nakon branja i odvajanje ulja od vegetacijske vode odmah nakon ekstrakcije neophodni su za održavanje niske kiselosti ulja. Dakle, kiselost ulja je dobar pokazatelj tretiranja maslina prije samog procesuiranja i duljine vremena od branja do prešanja.

Peroksidni broj je pokazatelj primarne oksidacije u ulju koja dovodi do nastanka već spomenutih peroksida i hidroperoksida masnih kiselina, koji nemaju specifičan okus i miris. Vjerojatnost raspada hidroperoksida povećana je za vrijeme skladištenja. Ovaj proces je moguće odgoditi za kraće vrijeme, jednu ili dvije godine, u visoko kvalitetnim maslinovim uljima bogatima antioksidansima. No, jednom kada je peroksid prisutan, užeglost je neizbježna. Rafiniranje je onda jedini način da se oni uklone.

Produkti sekundarne oksidacije dektektiraju se UV spektrofotometrijskim određivanjem (K_{232} i K_{270}) i provjerom senzorskih svojstava ulja (www.agbiolab.com; Goldsmith i sur., 2013).

Također, u Pravilniku o uljima od ploda i komine maslina (NN br. 7/2009) maslinova ulja su podjeljena u osam trgovačkih kategorija: ekstra djevičansko maslinovo ulje, djevičansko maslinovo ulje, maslinovo ulje lampante, rafinirano maslinovo ulje, maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja, sirovo ulje komine maslina, rafinirano ulje komine maslina i ulje komine maslina.

Za proizvodnju ekstra djevičanskog maslinovog ulja i djevičanskog maslinovog ulja koriste se plodovi stabla masline (*Olea europea* L.) koji se podvrgavaju isključivo mehaničkim ili drugim fizikalnim postupcima, u uvjetima koji ne dovode do promjena sastojaka ulja te bez dodataka pomoćnih sredstava kemijskog ili biokemijskog djelovanja. Ekstra djevičansko maslinovo ulje i djevičansko maslinovo ulje smiju se podvrgnuti isključivo postupcima pranja, centrifugiranja, dekantacije i/ili filtracije. Takva ulja se dobivaju isključivo hladnim postupcima koji ne prelaze temperaturu od 27 °C: hladnim prešanjem ili procjeđivanjem odnosno centrifugiranjem maslinovog tijesta.

Jedina razlika između ekstra djevičanskog i djevičanskog maslinovog ulja je udio slobodnih masnih kiselina koji kod ekstra djevičanskog mora biti do 0,8 %, a kod djevičanskog maslinovog ulja do 2%. Sva druga navedna ulja su puno lošije kakvoće.

1.2. POLIFENOLI

Iako se njihovo određivanje ne svrstava u osnovne pokazatelje kakvoće maslinovog ulja, polifenoli su jedna od najvažnijih skupina sastojaka maslinovog ulja i koji umnogome utječu na njegovu kakvoću - kako organoleptičku, tako na kemijsku i prehrambenu. Takav sastav polifenola nije moguće naći u nijednom drugom biljnom ulju.

Polifenoli su učinkoviti prirodni antioksidansi koji štite maslinovo ulje od autooksidacijskih promjena te time pridonose stabilnosti ulja u smislu očuvanja njegove kakvoće i trajnosti. Polifenoli ustvari štite nezasićene masne kiseline koje se nalaze u sastavu triglicerida maslinovog ulja od oksidacije. U maslinovom ulju različite fenolne tvari dolaze u slobodnom obliku ili vezane s različitim spojevima u kompleksne tvari koje starenjem ulja degradiraju tj. raspadaju se na svoje sastavne dijelove. Osim toga, polifenoli su odgovorni za svojstva okusa (pikantnost), no nisu manje značajni ni kao antioksidansi koji usporavaju degradaciju kakvoće ulja (Šindrak i sur., 2007).

Antioksidativna aktivnost sastavnica maslinovog ulja dobila je veliku pozornost posljednjih godina budući da ju se povezuje s prevencijom kroničnih i degenerativnih bolesti kao što su koronarna bolest srca, neurodegenerativne bolesti i tumori. Naime, reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) odgovorni su za oksidativni stres te gore navedne bolesti. ROS oksidiraju lipoproteine deponirane u arterijama što dovodi do ateroskleroze, a također su odgovorni i za kancerogene procese jer su u stanju prouzročiti oksidativno oštećenje DNA (Servili i sur., 2004).

Na količinu polifenola u maslinovom ulju utječu mnogi parametri: stupanj zrelosti ploda, sorta masline, nadmorska visina, opskrbljenost vodom, postupci ekstrakcije ulja, uvjeti skladištenja te rafiniranje. Rafinirana maslinova ulja su ulja s najmanjom količinom polifenola jer se velikim dijelom gube rafiniranjem, dok su ekstra djevičanska i djevičanska maslinova ulja pokazivala najviše vrijednosti (Šindrak i sur., 2007).

1.3. UTJECAJ ZAGRIJAVANJA NA ODRŽIVOST MASLINOVOG ULJA

U današnje vrijeme potrošači zahtijevaju zdrava, visoko kvalitetna maslinova ulja. Ovaj zahtjev se odnosi na odgovarajući sastav masnih kiselina (visoki udio jednostruko zasićenih masnih kiselina, kao što je oleinska kiselina) i na smanjenu emisiju potencijalno toksičnih spojeva, kao što su aldehidi. Ispravan izbor ulja za prženje, koje je jedan od najčešćih postupaka pripreme hrane, važan je iz mnogo razloga. Kao prvo, ulje se koristi kao medij za prijenos topline i mora biti u stanju izdržati visoke temperature te imati dovoljno visoku stabilnost na visokim temperaturama. Kao drugo, hrana koja se prži upija dio ulja i samim time ulje treba imati visoku oksidativnu stabilnost. Ne smije se zanemariti da ulje mora biti ukusno i hranjivo. Konačno, ulje treba biti što je više moguće stabilno tijekom zagrijavanja što podrazumijeva najmanju moguću emisiju potencijalno toksičnih hlapljivih organskih spojeva (Harinageswara i sur., 2009).

Kemijske reakcije koje se odvijaju u ulju tijekom prženja su: oksidacija, polimerizacija i hidroliza. Do termooksidacijskih promjena dolazi prilikom zagrijavanja ulja na temperaturama većim od 150°C uz prisutnost vodene pare i zraka. Pri tome nastaju cikličke masne kiseline, dimeri, polimeri, oksipolimeri i drugi spojevi. Povećanjem stupnja polimerizacije povećava se i relativna gustoća, indeks refrakcije i viskoznost ulja, a dolazi i do promjene boje ulja (Cerretani i sur., 2009). Naime, tijekom prženja dolazi do promjena senzorskih karakteristika hrane tj. ulje dobiva aromu po pečenom, smeđu boju, a mijenja se i tekstura proizvoda. Termooksidacijske promjene ovise o vrsti ulja, temperaturi i vremenu trajanja zagrijavanja. Dovode do nastanka slobodnih radikala u većoj količini, a pri visokim temperaturama moguća je i izomerizacija te formiranje trans izomera (Albi i sur., 1997).

Stupanj oksidacije ulja djelovanjem zagrijavanja ovisi o udjelu polinezasićenih masnih kiselina, a vrijednost slobodnih masnih kiselina se povećava. Oksidacijska stabilnost ulja je smanjena, a digliceridi i trigliceridi su skloni toplinskoj hidrolizi, ukoliko je prisutna veća količina vode. Zagrijavanje dovodi do povećane razgradnje nutritivnih spojeva kao što su vitamini, esencijalne masne kiseline i polifenoli (Zahir i sur., 2014).

Iznimno je važno kod kuhanja ne samo s maslinovim, već i drugim biljnim uljima da se ulje ne zagrijava iznad njegove točke dimljenja. Točka dimljenja je temperatura pri kojoj se ulje počne kontinuirano dimiti i može se vidjeti u obliku plavkastih para. Dim je indikator razgradnje ulja na glicerol i slobodne masne kiseline. Glicerol se dalje razgrađuje do akroleina (2-propenala), koji je kancerogen i jedan od glavnih sastojaka plavkastog dima. Kolika će biti temperatura dimljenja, najviše ovisi o udjelu masnih kiselina. Utjecaj stupnja nezasićenosti masnih kiselina je minimalan, ali duljina lanca igra važnu ulogu; ulja koja sadrže kratkolančane masne kiseline imaju nižu temperaturu dimljenja. Generalno pravilo je da što je viša temperatura dimljenja, to je ulje pogodnije za prženje. Ulja s temperaturom dimljenja ispod 200 °C zasigurno nisu prikladna za duboko prženje pri kojem se mogu dostići temperature od 180 °C.

Istraživanja su pokazala da se emisija hlapljivih tvari iz ulja (aldehida, ketona, alkohola i drugih spojeva) postupno povećava s povišenjem temperature dok ne dođe do temperature dimljenja; od te temperature emisija se naglo povećava (Harinageswara i sur., 2009).

Temperatura je najvažniji faktor koji se treba razmotriti pri procjeni oksidativne stabilnosti ulja, budući da stupanj oksidacije eksponencijalno raste s porastom temperature, no ne treba zaboraviti i utjecaj antioksidansa. Energija aktivacije (energija koja je potrebna da iz reaktanata nastanu produkti) oksidacije lipida je puno veća u prisutnosti antioksidansa te je stoga u njihovoj prisutnosti puno manja emisija toksičnih hlapljivih tvari iz ulja.

Maslinovo se ulje, u usporedbi s drugim biljnim uljima, pokazalo kao adekvatno za termičku obradu. Njegova temperatura dimljenja je 210 °C, što je puno više od maksimalne temperature koja se postiže prženjem. Također, maslinovo ulje je bogato antioksidansima kao što su polifenoli i α -tokoferol te zbog toga, i visokog udjela oleinske kiseline, pokazuje visoku energiju aktivacije oksidacije lipida. Višu energiju aktivacije od maslinovog ulja pokazalo je jedino kokosovo ulje jer se pretežito sastoji od zasićenih masnih kiselina. Međutim, kokosovo ulje nije prikladno za kuhanje zbog niske temperature dimljenja (Harinageswara i sur., 2009).

Među polifenole s najvećom antioksidativnom aktivnošću ubrajaju se derivati oleuropeina. No, istraživanja koja su se radila posljednjih godina pokazala kako se tijekom prženja njegova vrijednost u ulju znatno snižava. Polifenolni derivati ligstrozida i lignana pokazali su visoku stabilnost tijekom termičke obrade maslinovog ulja, što ukazuje na njihov smanjen protektivni efekt na oksidativne reakcije tijekom kuhanja (Servili i sur., 2004).

Nadalje, znanstvena istraživanja su pokazala kako su polifenoli efektini stabilizatori α -tokoferola za vrijeme zagrijavanja maslinovog ulja, budući da su se njegove vrijednosti znatno manje snižavale tijekom zagrijavanja u uljima s velikim udjelom polifenola. Ovi podaci upućuju na doprinos maslinovog ulja nutritivnoj vrijednosti kuhane hrane (Servili i sur., 2004).

Persson i suradnici (2003) su u svom radu ispitivali nastajanje heterocikličkih amina (HA) tijekom prženja goveđih burgera koji su se pokazali kao mutageni i kancerogeni spojevi. Prekursori nastanka HA su aminokiseline, kreatin ili kreatinin i šećeri, spojevi koji se prirodno nalaze u mišićnom tkivu. Rezultati su pokazali da najmanje HA nastaje kad se meso prži bez ikakve masnoće, što je moguće objasniti poboljšanim prijenosom topline pri dodatku ulja, ali se iz praktičnih razloga ne preporučuje pržiti meso bez dodatka masnoće. Ipak manje HA je nastalo tijekom prženja na djevičanskom maslinovom ulju, nego što je nastalo prženjem na rafiniranom maslinovom ulju. Taj je rezultat moguće pripisati visokoj koncentraciji polifenola u djevičanskom maslinovom ulju koji kao antioksidansi interferiraju pri nastanku HA

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Polifenolne tvari jedan su od ključnih parametara u procjeni kvalitete maslinovih ulja. Djevičansko maslinovo ulje je jedinstveno među drugim biljnim uljima zbog visokog udjela polifenolnih tvari zajedno s visokim sadržajem nezasićenih masnih kiselina koji zajedno doprinose zdravstvenoj vrijednosti ovih ulja. Kako sastav polifenola u maslinovim uljima ovisi o različitim čimbenicima, kao npr. o sorti masline, agronomskim uvjetima, vremenu branja i tehnologiji dobivanja ulja, određivanje njihovog sadržaja je od velike važnosti.

Mnogi se analitički postupci koriste za određivanje ukupnog sadržaja polifenolnih tvari, no razne tehnike ekstrakcije, uvjeti i načini kvantifikacije pridonijeli su razlikama u izmjerenim vrijednostima ukupnog sadržaja polifenolnih tvari u maslinovim uljima.

Cilj ovog rada bio je ispitati koja je naprigodnija tehnika kvantitativne izolacije fenolne frakcije maslinovog ulja između dvije osnovne tehnike ekstrakcije, tj. ekstrakcije tekuće-tekuće (engl. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE) i disperzivne ekstrakcije čvrstom fazom (engl. *Dispersive Solid Phase Extraction*, dSPE), tj. QuEChERS (engl. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) tehnike.

Također, cilj ovog rada bio je i procijeniti kvalitetu ispitivanih maslinovih ulja te ispitati utjecaj zagrijavanja maslinovog ulja na ukupni sadržaj polifenolnih tvari.

1. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- Acetonitril, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Njemačka)
- Galna kiselina, certificirani referentni materijal, Trace CERT® (Fluka Analytical, Švicarska)
- Metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Natrijev karbonat (Sigma Aldrich, SAD)
- *n*-heksan, ACS-reag. Ph. Eur. (CARLO ERBA, Italija)
- Octena kiselina, p.a. (Kemika, Hrvatska)

3.1.2. Uzorci

- 10 uzoraka maslinovog ulja sakupljeni su iz različitih dijelova Republike Hrvatske

3.1.3. Radni instrumenti

- Sustav za pročišćavanje vode (Milipore, Bedford, MA, SAD)
- UV-Vis spektrofotometar Agilent 8453 E (Hewlett Packard, Njemačka)

3.1.4. Pribor

- Automatske jednokanalne pipete podesivog volumena za pipetiranje uzoraka (Rainin, Švicarska)
- Centrifugirka, Nanofuge (Hoefer Scientific Instruments, SAD)
- Grijalica/mješalica Ika C-MAG HS 7 (Ika-Werke GMBH&CO.KG, Njemačka)
- Kiveta za UV-Vis spektrofotometar 1 cm
- Analitička vaga (Mettler Toledo, Švicarska)
- QuEChERS Enhanced Matrix Removal – Lipid (Agilent Technologies, SAD)
- Tresilica Lab Dencer – vortex (Ika-Werke GMBH&CO.KG, Njemačka)

3.1.4. Programski paketi

- Microsoft Office Excel (Microsoft, Seattle, WA, SAD)

3.2. Metode

Određivanje ukupnih polifenola u maslinovom ulju provedeno je primjenom UV-VIS spektrofotometrije i Folin-Ciocalteu reagensa. Analiti su iz uzorka ekstrahirani primjenom ekstrakcije tekuće-tekuće i QuEChERS tehnike. Nakon optimizacije postupka ekstrakcije i određivanja ispitan je utjecaj zagrijavanja na sadržaj polifenola u maslinovom ulju.

3.2.1. Priprema standardnih otopina

Radne otopine za izradu baždarnog pravca pripremljene su otapanjem galne kiseline u 60% metanolu (2 mg/mL).

Koncentracije radnih otopina galne kiseline iznosile su od 0,4, 0,8, 2,0, 4,0, 8,0 i 10,0 µg/mL.

Folin-Ciocalteu reagens pripremljen je razrjeđivanjem s ultračistom vodom u omjeru 1:10.

Natrijev karbonat pripremljen je kao 10% otopina u ultračistoj vodi.

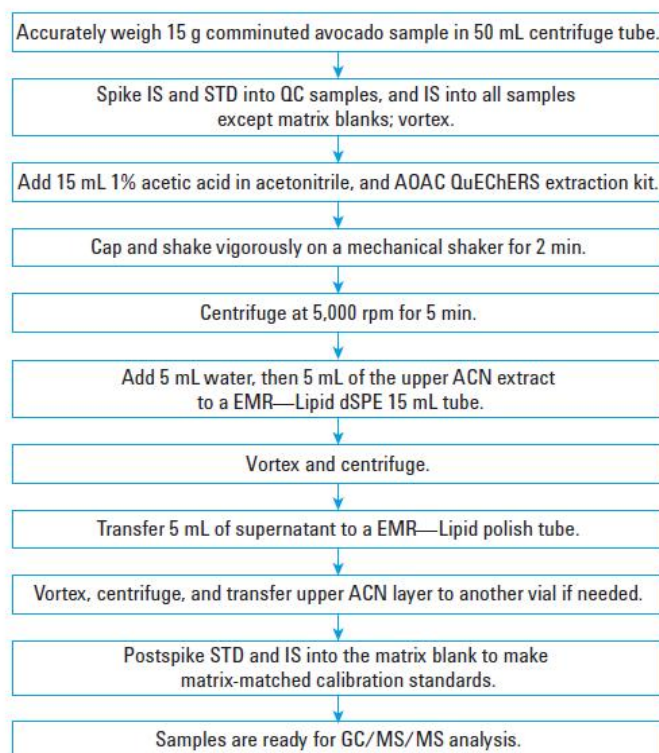
3.2.2. Ekstrakcija polifenola

3.2.2.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće

U 2,5 g maslinovih ulja doda se 5 mL *n*-heksana i 3 mL 60%-tnog metanola. Smjesa se stavi na tresilicu 2 minute nakon čega se uzorci centrifugiraju. Nakon odvajanja faza postupak se ponovi još jednom s heksanskom fazom. Na kraju se spoje obje metanolne faze u kojima su ekstrahirane fenolne tvari.

3.2.2.2. QuEChERS tehnika

Lipidne tvari se uklone iz uzroka primjenom QuEChERS Enhanced Matrix Removal – Lipid disperzivne ekstrakcije čvrstom fazom. Postupak ekstrakcije provede se prema uputama proizvođača uz dodatak acetonitrila i 1%-tne octene kiseline (**Slika 1**).



Slika 1. Shematski prikaz QuEChERS Enhanced Matrix Removal – Lipid protokola.

3.2.3. Određivanje ukupnih polifenola primjenom UV-VIS spektrofotometrije

Za određivanje ukupnih fenolnih tvari u odmjenu tikvicu od 5 mL otpipetira se 0,20 mL metanolnog ekstrakta koji se potom razrijedi ultračistom vodom do 2,5 mL. Nakon toga doda se 0,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa, a nakon 3 minute doda se 0,5 mL otopine natrijeva karbonata. Zatim se smjesa dobro promućka i nadopuni vodom do oznake. Nakon točno dva sata, mjeri se apsorbancija na valnoj duljini od 725 nm, uz slijepu probu.

Količina ukupnih polifenola odredi se pomoću baždarnog pravca galne kiseline, a sadržaj ukupnih polifenola izrazi se kao mg galne kiseline po kg uzorka.

3.2.4. Ispitivanje utjecaja zagrijavanja na sadržaj ukupnih polifenola u maslinovom ulju

Utjecaj zagrijavanja na sadržaj ukupnih polifenola u maslinovom ulju ispita se grijanjem uzorka na termostatiranoj grijalici u vodenoj kupelji tijekom 5, 15, 30 i 60 minuta na temperaturi od 50 °C. Nakon zagrijavanja ulje se ostavi na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta kako bi se ohladilo. Potom se provede određivanje sadržaja ukupnih polifenola metodom opisanom u poglavlju 3.2.3

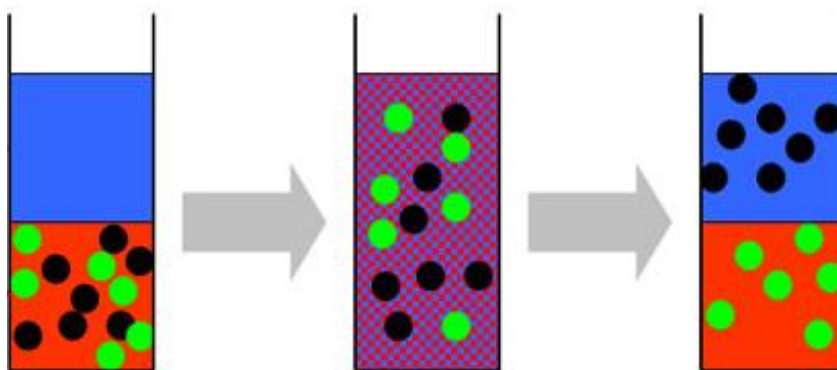
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Optimizacija postupka ekstrakcije

Za ekstrakciju polifenola iz maslinova ulja primijenjene su dvije tehnike:

1. Ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE) i
2. Disperzivna ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Dispersive Solid Phase Extraction*, dSPE)

Ekstrakcija tekuće-tekuće je važna je i vrlo česta separacijska tehnika za velik raspon analita. Tijekom ekstrakcije tekuće-tekuće analit raspodjeljuje između dviju tekućih faza koje se ne miješaju. Prenos analita iz jedne faze u drugu zove se razdjeljenje, a analit se razdjeljuje s obzirom na relativnu topljivost u pojedinoj fazi i postiže ravnotežu (**Slika 2**).



Slika 2. Shematski prikaz ekstrakcije tekuće-tekuće

(preuzeto s www.entertainmentbazar.com).

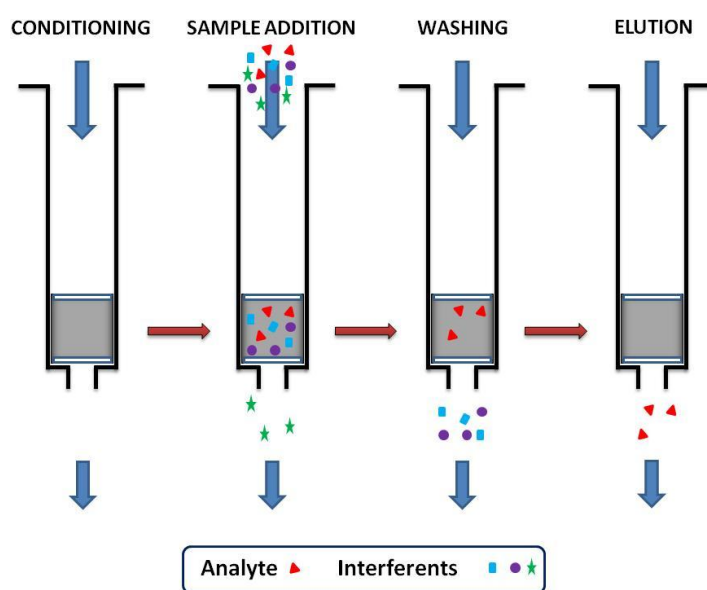
Konvencionalno se provodi u lijevcima za odjeljivanje i prate je različiti nedostaci kao što je nastajanje emulzije, nezadovoljavajuće odjeljivanje faza, nizak stupanj automatizacije te veliki ljudski rad. Također je potrebno istaknuti kako je zbog velike potrošnje organskih otapala ekološki neprihvatljiva. No, danas je ta metoda osuvremenjena uvođenjem u rad posebno pripremljenih kolona punjenih anorganskim materijalima (npr. dijatomejska zemlja) širokih pora na koji se nanose vodeni ekstrakti i raspoređuje u obliku tankog filma. Nadalje, sve su popularniji ekstrakcijski postupci tijekom kojih se primjenjuje značajno manje organskih otapala poput mikroekstrakcije tekuće-tekuće (engl. *liquid-liquid microextraction*, LLME).

Ekstrakcija čvrstom fazom zasniva se na propuštanju velike količine uzoraka kroz reaktivni sorbens smješten u ulošcima, kolonama, 96-ekstrakcijskim pločicama ili u disperzivnom

obliku. Danas je ekstrakcija čvrstom fazom našla primjenu u analitici lijekova, dodataka prehrani, hrane, pića te u bioanalitici. Tome su pridonijele mnoge prednosti ove metode kao postizanje visokog prinosa, manja upotreba organskih otapala, odsutnost stvaranja emulzija, jednostavnost rukovanja kao i mogućnost automatizacije.

Najčešće se ekstrakcija čvrstom fazom provodi u četiri koraka:

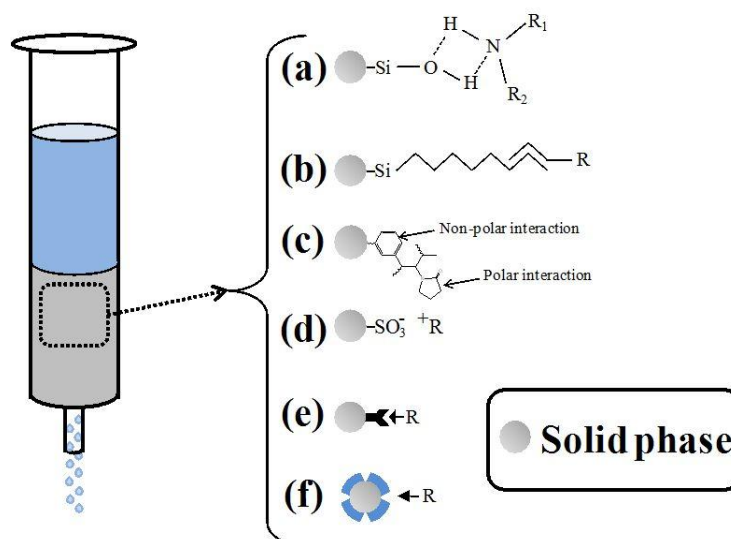
1. kondicioniranje odnosno solvatacija reaktivnog sorbensa,
2. nanošenje uzorka,
3. ispiranje interferencija i
4. elucija analita (**Slika 3**).



Slika 3. Shematski prikaz ekstrakcije čvrstom fazom

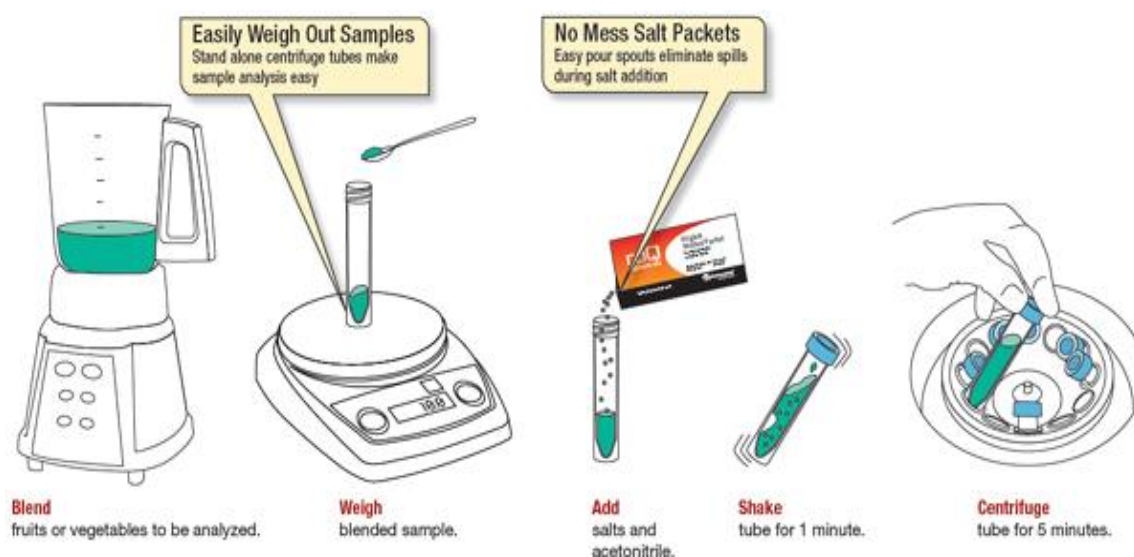
(preuzeto s www.intechopen.com).

Svrha reaktivnog sorbensa u ekstrakciji čvrstom fazom je vezanje odnosno zadržavanje analita. Najčešće vrste sorbensa su silikagel, modificirani silikagel, različiti polimeri, nanomaterijali, materijali ograničenog pristupa te imunoafiniteti sorbensi (**Slika 4**). Veliki raspon komercijalno dostupnih reaktivnih sorbensa omogućava dobru selektivnost postupka pripreme uzorka.



Slika 4. Reaktivni sorbensi koji se primjenjuju u ekstrakciji čvrstom fazom.

Disperzivna ekstrakcija čvrstom fazom je jednostavna tehnika ekstrakcije analita iz velikog broja uzoraka. Najčešće se primjenjuje u analitici hrane i pića, dok je primjena u analitici lijekova i dodataka prehrani značajno rjeđa. Pod disperzivnu ekstrakciju čvrstom fazom ubraja se i tzv. QuEChERS (engl. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) tehnika koja pokriva raznovrsne tehnike pripreme i prečišćavanja uzorka. Ova tehnika najčešće se primjenjuje za multirezidualnu analizu pesticida u uzorcima hrane, pića i poljoprivrednih proizvoda. No, u novije vrijeme našla je primjenu i u drugim područjima poput bioanalitike. QuEChERS tehnika provodi se disperzivnim reaktivnim sorbensom smještenim u Falcon TM epruvetama. Najčešće se QuEChERS tehnikom nabavlja u obliku kita koji uključuje pored gore spomenutih reaktivnih sorbensa i Falcon TM epruveta i različite pufere kao i protokole za pojedine analite i uzorke. Na **Slici 5.** prikazan je općeniti protokol za pripremu uzoraka QuEChERS tehnikom.



Slika 5. protokol za pripremu uzoraka QuEChERS tehnikom

(preuzeto s www.phenomenex.com).

Pod najznačajnije prednosti QuEChERS tehnike ubrajaju se jednostavnost i kratko vrijeme pripreme uzoraka za analizu, relativno niska cijena ali prvenstveno iznimno dobra ekstrakcijska učinkovitost kao i ponovljivost ekstrakcijskog postupka (Nigović i sur., 2014).

U ovom diplomskom radu dvije tehnike pripreme uzoraka ispitane su kako bi se učinkovito polifenoli prisutni u maslinovom ulju odvojili od lipida. Primijenjena je ekstrakcija tekuće-tekuće s *n*-heksanom kao i QuEChERS tehnika namijenjena za uklanjanje lipida iz masnih uzoraka. Obje tehnike pripreme uzoraka korištene su kao zasebne, pojedinačne tehnike ali i u kombinaciji kako bi se postiglo učinkovitije uklanjanje lipida. Kao diluenti korišteni su organska otapala, metanol i acetonitril, ali i njihove razrijeđene otopine s ultračistom vodom (do 60% organskog otapala). Nadalje, ispitan je i utjecaj kiseline s 1%-tnom octenom kiselinom na ekstrakcijsku učinkovitost oba postupka.

U ispitanom uzorku maslinovog ulja različitim ekstrakcijskim postupcima nađeno je od 81,3 do 95,7 mg/kg uzorka izraženo kao ekvivalenti galne kiseline. Srednja vrijednost svih mjerenja iznosila je 89.6 mg/kg uzorka izraženo kao ekvivalenti galne kiseline.

Ekstrakcijom tekuće-tekuće s *n*-heksanom dobivene su nešto malo veće vrijednosti (od 85.2 do 95.7 mg/kg uzorka izraženo kao ekvivalenti galne kiseline) u odnosu na vrijednosti dobivene QuEChERS tehnikom (od 81.3 do 86,7 mg/kg uzorka izraženo kao ekvivalenti galne kiseline).

Svaki ekstrakcijski postupak ponovljen je u triplicatu te su dobivene relativne standardne devijacije (engl. *Relative Standard Deviations*, RSD) bile manje od 4.7%.

Provedenim istraživanjem uočeno je kako su obje ekstrakcijske tehnike jednostavne i brze. Iznimno niske RSD vrijednosti upućuju i kako su obje tehnike iznimno ponovljive. No, nešto veći prinosi dobiveni su ekstrakcijom tekuće-tekuće. Ovakav rezultat moguće je objasniti da su QuEChERS tehnikom uspješno uklonjeni lipidi ali i dio lipofilnih polifenola. Nadalje, potrebno je istaknuti kako je u odnosu na ekstrakciju tekuće-tekuće QuEChERS tehnika značajno skuplja te se nameće pitanje opravdanosti njene upotrebe.

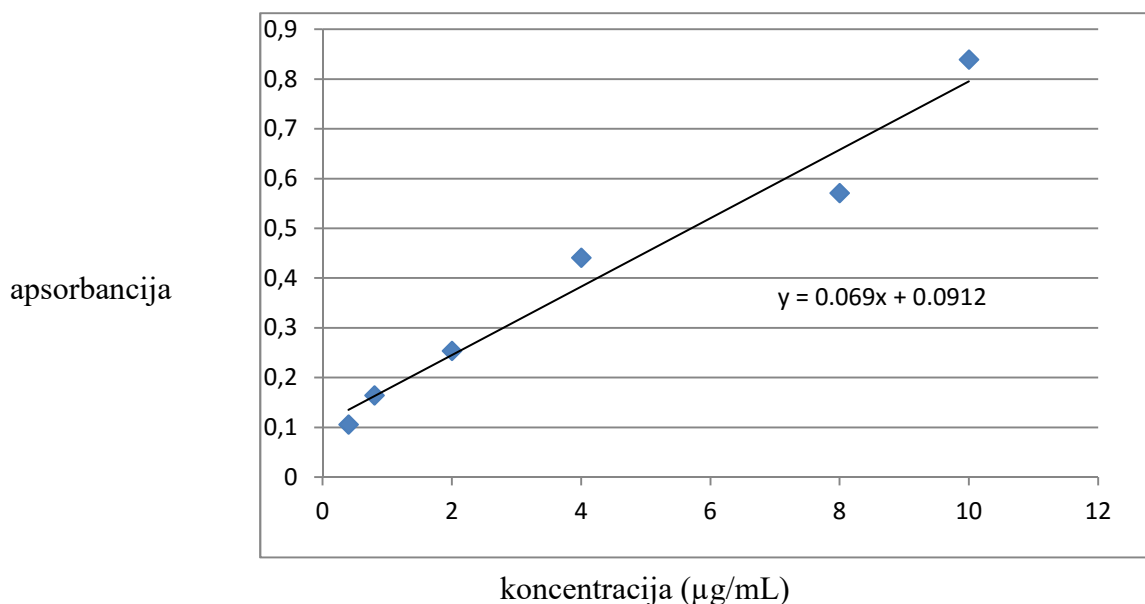
Zbog svega gore navedenog ekstrakcija tekuće-tekuće korištena je u daljnjim ispitivanjima.

4.2. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola primjenom Folin-Ciocalteu reagensa

Za ekstrakciju fenolnih tvari iz uzoraka ulja korišten je modificirani postupak prema Fuentes i suradnicima (2012), a za njihovo određivanje postupak prema Gutfinger-u (Gutfinger, 1981) uz Folin-Ciocalteu reagens (Singleton, 1965) .

Navedeni reagensi s reducirajućim fenolnim spojevima stvara kromogene spojeve čiji intenzitet obojenja moguće je mjeriti spektrofotometrijski na valnoj duljini od 725 nm. Kemijska struktura Folin-Ciocalteu reagensa se sastoji od fosfomolibdenskih i fosfovolframskih heteropoli kiselina koje su žute boje. No, zanimljivo je da njegova struktura nije u potpunosti još uvijek razjašnjena. Smatra se da u prisustvu fenola u bazičnom reakcijskom mediju nastaje kompleks Mo-W koji reakcijsku smjesu oboji u plavu boju.

Sadržaj ukupnih polifenola u maslinovim uljima određen je na temelju vrijednosti apsorbancija uzoraka koristeći baždarni pravac galne kiseline te su vrijednosti izražene kao kao mg galne kiseline po g uzorka. Za izradu baždarnog pravca korištene su otopine: galna kiselina (2 mg/ml) u 60%-tnom metanolu, 10%-tna vodena otopina natrijevog karbonata i Folin-Ciocalteu reagens (razrijeđen s ultračistom vodom u omjeru 1:10). Otopine galne kiseline rastućih koncentracija (od 0,4 do 10 µg/mL) priređene su za izradu baždarnog pravca. Na **Slici 6.** prikazana je baždarna krivulja te visoka vrijednost koeficijenta korelacije ($r^2 = 0,97$) upućuje na zadovoljavajuću linearnost metode.



Slika 6. Baždarni pravac.

10 uzoraka maslinova ulja sakupljeno je iz različitih područja Republike Hrvatske. Obuhvaćena su ulja iz područja istarskog poluotoka ali i Dalmacije. U pogledu strukture sorta sakupljena su ulja dobivena od autohtonih sorta poput oblice, istarske bjelice i drobnice, ali i intoduciranih sorti poput leccino, pendolino i drugih.

U istraživanje su uključena maslinova ulja dobivena od maslinara koji posjeduju maslinike male veličine te ulja proizvode isključivo za vlastite potrebe te od proizvođača maslinovog ulja koji imaju obrt registriran za obavljanje poljoprivredne djelatnosti kao i većih distributera maslinovih ulja.

Rezultati dobiveni UV/VIS spektrofotometrijom upućuju na iznimnu kvalitetu hrvatskih maslinovih ulja, odnosno sadržaj polifenolnih spojeva bio je u rasponu od 0.04 do 123,48 mg polifenola /kg maslinovog ulja (**Tablica 1**). Sva mjerenja provedena su u triplicatu te su RSD vrijednosti bile manje od 6,8%. Srednja vrijednost ukupnih polifenola iznosila je 62.95 mg polifenola /kg maslinovog ulja. Općenito gledajući, sličan udio polifenola nađen je u grčkim i čileanskim maslinovim uljima (Fuentes, 2012; Miniotti, 2010).

Ono što je potrebno istaknuti da je nešto veći udio polifenolnih spojeva nađen upravo u maslinovim uljima dobivenim od proizvođača koji imaju obrt registriran za obavljanje poljoprivredne djelatnosti.

Tablica 1. Sadržaj ukupnih polifenola u ispitanim maslinovim uljima.

uzorak	A	koncentracija ($\mu\text{g/ g}$)	RSD (%)
1	0,13607	32,51	4,5
2	0,18966	71,35	3,6
3	0,20068	79,33	2,4
4	0,14885	41,78	2,0
5	0,24738	113,17	2,4
6	0,13754	33,58	3,8
7	0,15277	44,62	1,6
8	0,09125	0,04	6,8
9	0,26160	123,48	3,5
10	0,21490	89,64	3,6

4.3. Ispitivanje utjecaja zagrijavanja na udio ukupnih polifenola u maslinovom ulju

Za ispitivanje utjecaja zagrijavanja na sadržaj ukupnih polifenola izabran je uzorak br. 9 s obzirom da uzorak sadrži najveću količinu polifenola. Utjecaj zagrijavanja ispitan je tako što je maslinovo ulje grijano u vodenoj kupelji 5, 15, 30 i 60 minuta na temperaturi od 50 °C. Nakon zagrijavanja ulje je ostavljeno na sobnoj temperaturi 15 minuta nakon čega je provedeno određivanje sadržaja ukupnih polifenola metodom opisanom u poglavlju 3.2.3.

Provedenim istraživanjem uočeno je da se udio ukupnih polifenola u uzorcima postepeno smanjuje s vremenom zagrijavanja (Tablica 2). Vrlo slični podaci dobiveni su u istraživanjima Allouche i suradika (2007) te Brenesa i suradnika (2002). Obje istraživačke skupine uočile su kako razgradnja polifenola ovisi o brojnim parametrima poput vrste masline, prisutnosti i količini drugih sastavnica ulja te tehnici zagrijavanja ulja.

No, potrebno je istaknuti kako su potrebna daljnja istraživanja u okviru produžavanja vremena zagrijavanja kao i povećanja temperature grijanja. Također je u istraživanje potrebno uključiti i druge metode obrade hrane poput prženja, pečenja te mikrovalne peći.

Tablica 2. Sadržaj ukupnih polifenola u maslinovom ulju br. 9 nakon zagrijavanja.

vrijeme zagrijavanja	koncentracija ($\mu\text{g/ g}$)	RSD (%)
0	123,48	3,5
5	122,91	4,1
15	121,11	4,5
30	118,50	3,7
60	102,42	4,9

5. ZAKLJUČAK

Ciljevi ovog rada obrazloženi su u poglavlju 2. Iz dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

1. Provedenim istraživanjem uočeno je kako su obje ekstrakcijske tehnike jednostavne i brze.
2. Iznimno niske RSD vrijednosti upućuju i kako su obje tehnike iznimno ponovljive.
3. Nešto veći prinosi dobiveni su ekstrakcijom tekuće-tekuće.
4. U odnosu na ekstrakciju tekuće-tekuće QuEChERS tehnika je značajno skuplja te se nameće pitanje opravdanosti njene upotrebe.
5. Rezultati dobiveni UV/VIS spektrofotometrijom upućuju na iznimnu kvalitetu hrvatskih maslinovih ulja, odnosno sadržaj polifenolnih spojeva bio je u rasponu od 0,04 do 123,48 mg polifenola / kg maslinovog ulja.
6. Udio ukupnih polifenola u uzorcima postepeno se smanjuje s vremenom zagrijavanja na istoj temperaturi.
7. Potrebna su daljnja istraživanja u okviru produžavanja vremena zagrijavanja kao i povećanja temperature grijanja.
8. Također je u istraživanje potrebno uključiti i druge metode obrade hrane poput prženja, pečenja te mikrovalne peći.

6. LITERATURA

1. Albi T, Lanzon A, Guinda A, León M, Pérez-Camino MC. Microwave and Conventional Heating Effects on Thermoxidative Degradation of Edible Fats. *Food Chem*, 1997, 45, 3795-3798.
2. Allouche Y, Jiménez A, Gaforio JJ, Uceda M, Beltrán G. How heating affects extra virgin olive oil quality indexes and chemical composition. *J Agric Food Chem*, 2007, 55, 9646-54.
3. Baggio G, Pagnan A, Muraca M, Martini S, Opportuno A, Bonanome A, Ambrosio GB, Ferrari S, Guarini P, Piccolo D, Manzato E, Corrocher R, Crepaldi G. Olive-oil-enriched diet: effect on serum lipoprotein levels and biliary cholesterol saturation. *Am J Clin Nutr*, 1988, 47, 960-964.
4. Brenes M, García A, Dobarganes MC, Velasco J, Romero C. Influence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenol content in virgin olive oil. *J Agric Food Chem*, 2002, 50, 5962-5967.
5. Cerretani L, Bendini A, Rodriguez-Estrada MT, Vittadini E, Chiavaro E. Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part I. Effect on chemical oxidative stability indices and phenolic compounds. *Food Chem*, 2009, 115 1381-1388.
6. Farràs M, Valls RM, Fernández-Castillejo S, Giralt M, Solà R, Subirana I, Motilva MJ, Konstantinidou V, Covas MI, Fitó M. Olive oil polyphenols enhance the expression of cholesterol efflux related genes *in vivo* in humans. A randomized controlled trial. *J Nutr Biochem*, 2013, 24, 1334-1339.
7. Fuentes E, Báez ME, Bravo M, Cid C, Labra F. Determination of total phenolic content in olive oil samples by UV–visible spectrometry and multivariate calibration. *Food Anal Method*, 2012, 5, 1311-1319.
8. Goldsmith CD, Stathopoulos CE, Golding JB, Roach PD. Fate of the phenolic compounds during olive oil production with the traditional press method. *IFRJ*, 2013, 21, 101-109.
9. Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1981, 58, 966-968.
10. Longobardi F, Ventrella A, Casiello G, Sacco D, Tasioula-Margari M, Kiritsakis AK, Kontominas MG. Characterisation of the geographical origin of Western Greek Virgin olive oils based on instrumental and multivariate statistical analysis. *Food Chem*, 2012, 133, 169-175.
11. Minioti KS, Georgiou CA. Comparison of different tests used in mapping the Greek virgin olive oil production for the determination of its total antioxidant capacity. *GRASAS Y ACEITES*, 2010, 61, 45-51.
12. Olive Oil Analysis Explained – Part I: Basic Assays, 2011., <http://www.agbiolab.com>, pristupljeno 27. 6. 2016.
13. Paradiso VM, Gomes T, Nasti R, Caponio F, Summo C. Effects of free fatty acids on the oxidative processes in purified olive oil. *Food Res Inter*, 2010, 43, 1389-1394.
14. Persson E, Graziani G, Ferracane R, Fogliano V, Skog K. Influence of antioxidants in virgin olive oil on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers. *Food Chem Tox*, 2003, 41, 1587-1597.

15. Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina, 2009, Zagreb, Narodne novine, broj 7 (NN/7/09).
16. Servili M, Selvaggini R, Esposito S, Taticchi A, Montedoro G, Morozzi G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J Chromatogr A*, 2004, 1054, 113-127.
17. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Viticult*, 1965, 16, 144-158.
18. Šindrak Z, Benčić Đ, Voća S, Barberić A. Ukupne fenolne tvari u sortnim istarskim maslinovim uljima. *Pomologia Croatica*, 2007, 13, 17-30.
19. Zahir E, Saeed R, Hameed MA, Yousuf A. Study of physicochemical properties of edible oil and evaluation of frying oil quality by Fourier Transform-Infrared (FT-IR) Spectroscopy. *Arabian Journal of Chemistry*, 2014., <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.025>, pristupljeno 27. 6. 2016.
20. Žanetić M, Gugić M. Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja. *Pomologia Croatica*, 2006, 12, 159-173.

7. SAŽETAK

Maslinovo ulje je oduvijek bila važna namirnica u mediteranskoj prehrani te se takav način prehrane povezuje s izrazito rijetkom pojavom koronarnih i malignih bolesti. Maslinovo ulje ima veliku prehrambenu, preventivnu pa i terapijsku vrijednost i stoga je iznimno važno ispitati njegovu kvalitetu koja je usko povezana sa sadržajem polifenolnih tvari u ulju. Također, maslinovo ulje se koristi u različitim postupcima pripreme hrane koji uključuju termičku obradu te je ispitivanje njegove stabilnosti pri povišenim temperaturama također neophodno. Različite se analitičke tehnike koriste za određivanje sadržaja ukupnih polifenola u maslinovim uljima, a uključuju dva osnovna koraka: ekstrakciju iz uzorka maslinovog ulja i kvantifikaciju. U ovom radu ispitivane su dvije tehnike ekstrakcije, ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE) i disperzivna ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Dispersive Solid Phase Extraction*, dSPE), tj. QuEChERS (engl. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) tehnika. Osim toga, mjerio se i sadržaj ukupnih polifenolnih tvari u ispitivanim maslinovim uljima prije i nakon zagrijavanja na 50 °C. Rezultati su pokazali da je ekstrakcija tekuće-tekuće prirodnija za ekstrakciju polifenolnih tvari iz maslinovog ulja zbog nešto većeg prinosa. Udio ukupnih polifenola postupno se smanjivao s vremenom zagrijavanja.

8. SUMMARY

Olive oil has always been important part of the Mediterranean diet, associated with an extremely rare occurrence of coronary and malignant diseases. Olive oil has a great nutritive, preventive and therapeutic value and therefore it is very important to examine its quality, which is closely associated with the total polyphenolic content of the oil. Also, olive oil is used in a variety of procedures of food preparation, which includes thermal treatment, and testing its stability at elevated temperatures is also necessary. Different analytical techniques are used to determine the total polyphenolic content in olive oils, and they include two basic steps: extraction from a sample of olive oil and quantification. In this study the two techniques for extraction of polyphenolic compounds from olive oil were used, liquid-liquid extraction (LLE) and solid phase dispersion extraction (DSPE), ie. QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) technique. In addition, the total polyphenolic content was tested before and after heating olive oil samples at 50 °C. The results showed that the liquid-liquid extraction is more appropriate for extraction of polyphenolic compounds because it showed slightly higher yields. Finally, the value of total polyphenolic content gradually decreased with heating time.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UTJECAJ ZAGRIJAVANJA MASLINOVG ULJA NA SADRŽAJ POLIFENOLNIH TVARI

Iva Marinac-Andić

SAŽETAK

Maslinovo ulje je oduvijek bila važna namirnica u mediteranskoj prehrani te se takav način prehrane povezuje s izrazito rijetkom pojavom koronarnih i malignih bolesti. Maslinovo ulje ima veliku prehrambenu, preventivnu pa i terapijsku vrijednost i stoga je iznimno važno ispitati njegovu kvalitetu koja je usko povezana sa sadržajem polifenolnih tvari u ulju. Također, maslinovo ulje se koristi u različitim postupcima pripreme hrane koji uključuju termičku obradu te je ispitivanje njegove stabilnosti pri povišenim temperaturama također neophodno. Različite se analitičke tehnike koriste za određivanje sadržaja ukupnih polifenola u maslinovim uljima, a uključuju dva osnovna koraka: ekstrakciju iz uzorka maslinovog ulja i kvantifikaciju. U ovom radu ispitivane su dvije tehnike ekstrakcije, ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. Liquid-Liquid Extraction, LLE) i disperzivna ekstrakcija čvrstom fazom (engl. Dispersive Solid Phase Extraction, dSPE), tj. QuEChERS (engl. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) tehnika. Osim toga, mjerio se i sadržaj ukupnih polifenolnih tvari u ispitivanim maslinovim uljima prije i nakon zagrijavanja na 50 °C. Rezultati su pokazali da je ekstrakcija tekuće-tekuće prirodnija za ekstrakciju polifenolnih tvari iz maslinovog ulja zbog nešto većeg prinosa. Udio ukupnih polifenola postupno se smanjivao s vremenom zagrijavanja.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad sadrži: 30 stranica, 6 grafičkih prikaza, 2 tablice i 20 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: maslinovo ulje, polifenoli, LLE, dSPE, QuEChERS, zagrijavanje

Mentor: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić, znanstveni suradnik.

Rad prihvaćen: srpanj 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Analytics and Control of Medicines
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

INFLUENCE OF HEATING OLIVE OIL ON THE TOTAL POLYPHENOLIC CONTENT

Iva Marinac-Andić

SUMMARY

Olive oil has always been important part of the Mediterranean diet, associated with an extremely rare occurrence of coronary and malignant diseases. Olive oil has a great nutritive, preventive and therapeutic value and therefore it is very important to examine its quality, which is closely associated with the total polyphenolic content of the oil. Also, olive oil is used in a variety of procedures of food preparation, which includes thermal treatment, and testing its stability at elevated temperatures is also necessary. Different analytical techniques are used to determine the total polyphenolic content in olive oils, and they include two basic steps: extraction from a sample of olive oil and quantification. In this study the two techniques for extraction of polyphenolic compounds from olive oil were used, liquid-liquid extraction (LLE) and solid phase dispersion extraction (DSPE), ie. QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) technique. In addition, the total polyphenolic content was tested before and after heating olive oil samples at 50 °C. The results showed that the liquid-liquid extraction is more appropriate for extraction of polyphenolic compounds because it showed slightly higher yields. Finally, the value of total polyphenolic content gradually decreased with heating time.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 30 pages, 6 figures, 2 tables and 20 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive oil, polyphenols, LLE, DSPE, QuEChERS, heating

Mentor: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Biljana Nigović, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Daniela Amidžić Klarić, Ph.D. *Research Associate*

The thesis was accepted: July 2016.